



# Sugerencias para el uso de equipos de CLAE

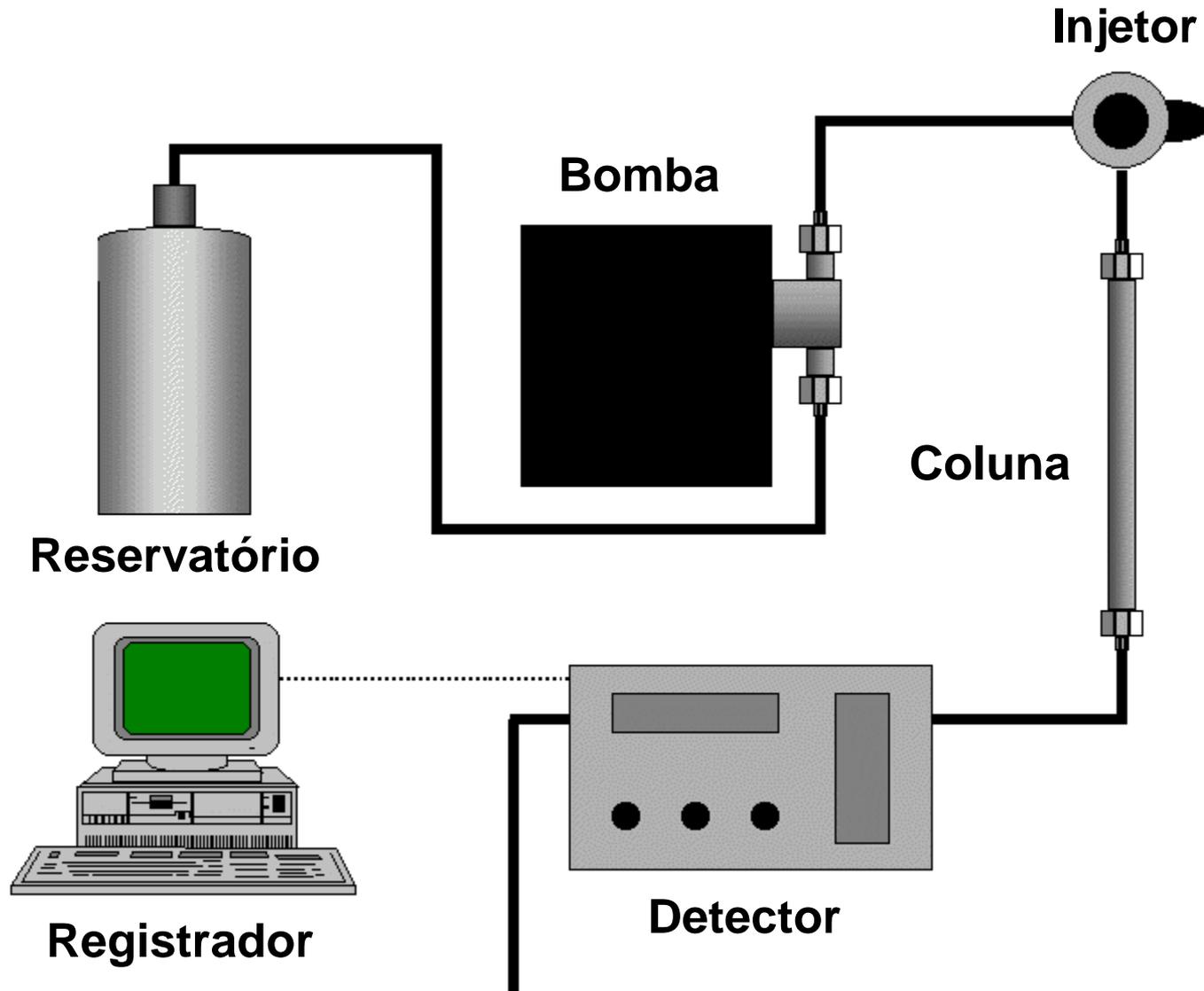
**Geison Modesti Costa**

**Escola de Verão em Farmacognosia**

**Fevereiro, 2010**

**Florianópolis**

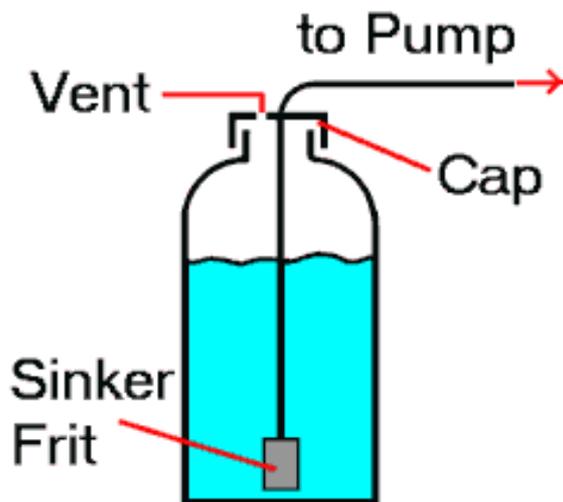
# ESQUEMA DE FUNCIONAMENTO HPLC



# Reservatório - Fase móvel



- Cerca de 50% de todos os problemas de análise e com o equipamento têm origem na Fase Móvel → **problemas de diagnóstico lento**
- Reagentes inadequados → a coluna e o equipamento são sempre os culpados.



# Fase móvel: orgânica



- Solventes devem ser grau de pureza HPLC ou HPLC/UV
- X • Graus técnico, para síntese, resíduos de pesticidas, para análise (P.A.), UV não servem. X



Isto tem implicações sobre a **garantia** do sistema e das colunas.

# Fase móvel: água

---



- São inadequadas
  - Água mono-destilada: contaminação de orgânicos voláteis
  - Água deionizada comum: contaminação alta de orgânicos devida à resina aromática
  - Água de osmose reversa: presença de íons e orgânicos de baixo peso molecular
  - Água de osmose reversa + eletro-deionização: orgânicos de baixo peso molecular.

# Fase móvel: água

---



- Água deve ser grau HPLC (**Milli-Q**)
  - Usar água destilada ou osmose reversa para alimentar o sistema Milli-Q
  - Livre de bactérias (esterilizada por membrana 0,22  $\mu\text{m}$ )
  - Resistividade  $\gg$  18 megohm ( $<$  1ppb de íons) “Resistividade indica somente o teor de íons”
  - Teor de orgânicos  $<$  20 ppb para análises normais

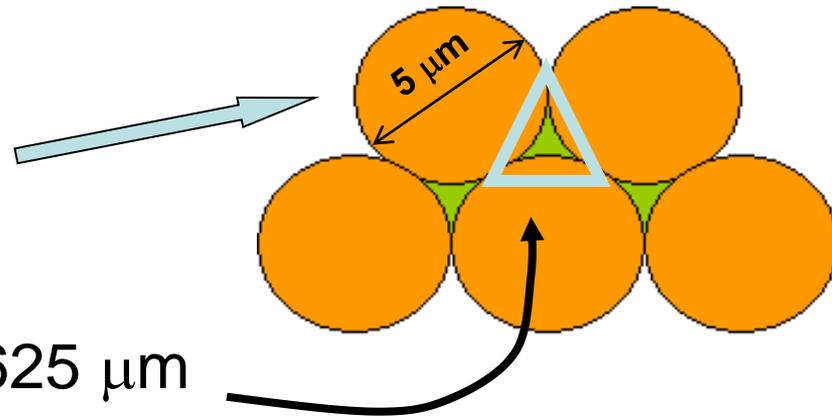
↪ **Milli-Q**: carvão ativado / 2 cartuchos de troca iônica / resina

# Fase móvel: Partículas em suspensão



- Partículas maiores que  $1/8$  do diâmetro da partícula da Fase Estacionária pode entupir os caminhos internos do leito
- Diâmetro  $5 \mu\text{m}$   $\rightarrow$  diâmetro de passagem =  $0,625 \mu\text{m}$ .

Diâmetro da FE =  $5 \mu\text{m}$



Diâmetro da passagem =  $0,625 \mu\text{m}$

# Fase móvel: filtração

---



- Para evitar entupimento do filtro de entrada da coluna (2  $\mu\text{m}$ ) basta a membrana de 0,45  $\mu\text{m}$
- Para colunas com recheios de partícula  $\geq 4 \mu\text{m}$  basta 0,45  $\mu\text{m}$ .
- Para recheios  $< 4 \mu\text{m}$  é interessante considerar o uso de membranas de porosidade 0,22  $\mu\text{m}$ .



# Membranas: compatibilidade química

---



- Membrana de ésteres de celulose: usadas na microbiologia só servem para água, água + tampão, água + ácido fraco.
- Teflon TFE serve para tudo, mas não permite passar água e acetonitrila sem ser molhado antes com outro orgânico (MeOH, THF, EtOH, etc.)
- Nylon permite uso de água e solventes em geral, exceto clorofórmio, éteres (THF), diclorometano e ácidos fortes



# Fase móvel: Preparo

---



- O correto é preparar **diariamente** a fase móvel
- Re-filtrar fase com tampão todos os dias (tendência a haver precipitação, crescimento de mofo).
- Cuidado com o pH da fase:
  - **Sílica comum: faixa de pH = 2-8**
    - $\text{CHCl}_3$ , testar sempre o pH, pois pode se transformar em HCl.
- Acertar o pH do tampão aquoso antes de misturar com a parte orgânica

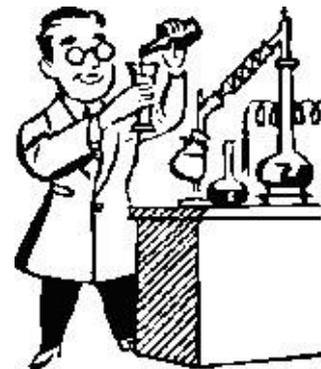


# Fase móvel: Preparo

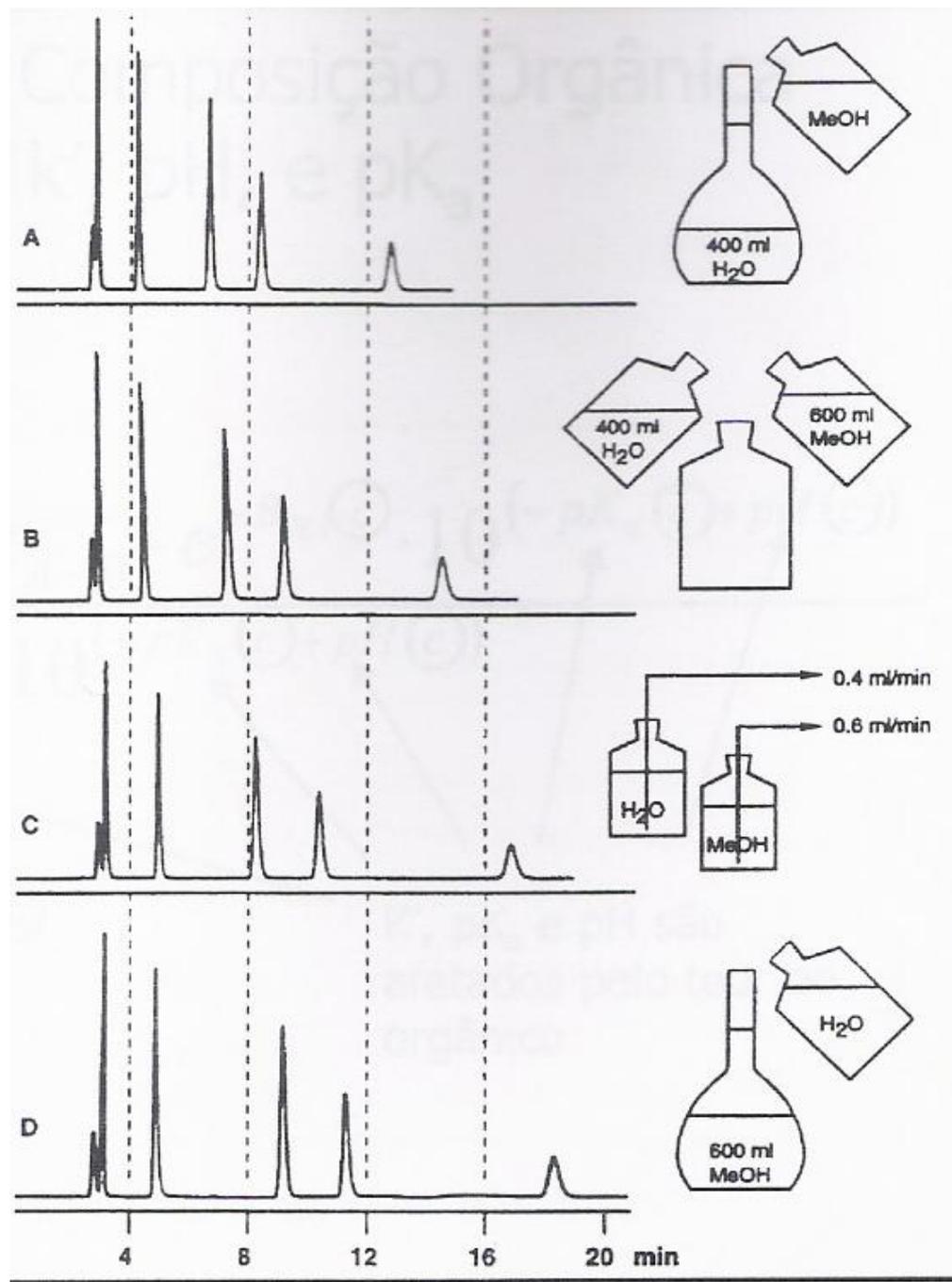
---



- Adicionar componentes voláteis (amônia, trietilamina, etc.) depois de filtrar com vácuo.
- Medir os componentes **separadamente** e depois misturar, antes da filtração.
- Não juntar um componente com outro, “avolumando” para o volume final.



# Preparo da fase móvel



# Fase móvel: desgaseificação

---



- Desgaseificação (remoção de  $O_2$  e  $N_2$ ) é indispensável para o bom funcionamento do sistema
  - Reprodutibilidade do fluxo (bolhas na bomba e ar dissolvido na fase)
  - Estabilidade da linha de base (bolhas no detector)
  - Transparência na faixa de baixa UV.  
 $O_2$  absorve  $< 215\text{nm}$ .  $\rightarrow$  ruído da linha de base

# Fase móvel: desgaseificação



## Insuficientes

- **Ultra-som**: muito lento, pouco eficiente, requer agitação
- **Vácuo**: lento (mínimo 20 minutos), requer agitação.



# Fase móvel: desgaseificação

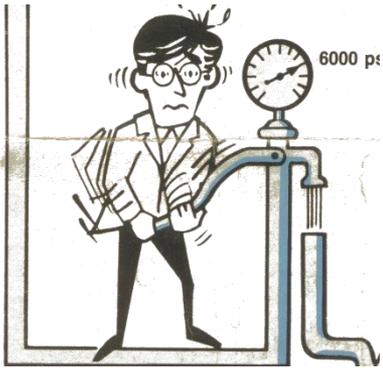
---



- **Vácuo + ultra-som**: total de ~10 minutos
  - Reaplicar de 12 em 12 horas (ou 24h)
  - Principalmente para misturas MeOH:H<sub>2</sub>O
- **Purga com He**: contínuo, hélio +caro, vazamentos aumentarão custo operacional, pouco conveniente.
- **Degasser**: contínuo, remove o ar logo antes de entrar na bomba; alto investimento inicial. Melhor opção a longo prazo.

**M  
e  
l  
h  
o  
r  
e  
s**

# BOMBAS



- Velocidade fluxo
  - 0,1-3,0 mL/min para colunas analíticas
  - > 5,0 mL/min para colunas preparativa



Influencia no modelo da bomba!

- Pressão operação: até 2500-3500 psi para separações analíticas

# INJEÇÃO: Preparação da amostra

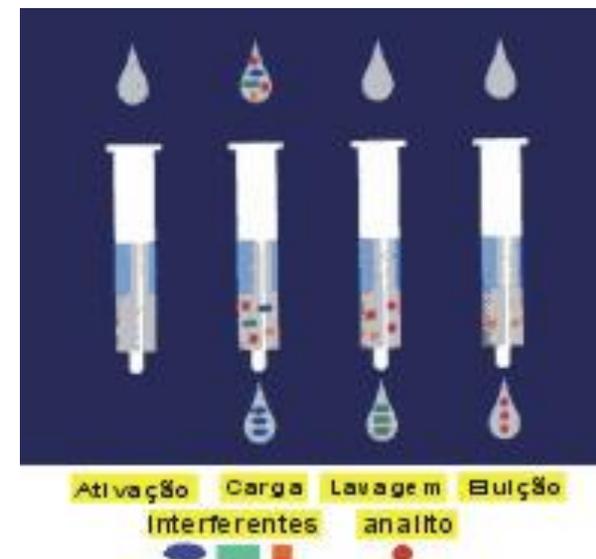


- Clean up da amostra:

- filtração e/ou centrifugação
- extração fase líquida (solventes)
- extração fase sólida (SPE)



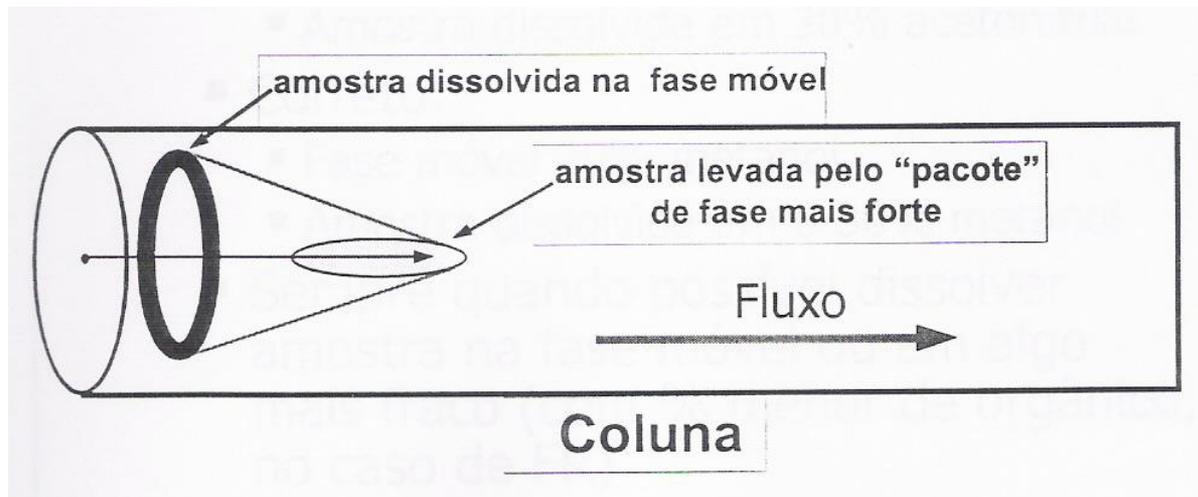
- Usar uma solução diluída



# Injeção: Preparação da amostra



- Dissolver a amostra na fase móvel;
- Evitar dissolver a amostra apenas em solventes orgânicos, principalmente se for mais “forte” que a FM;
- Amostra dissolvida em solvente mais “forte” que a fase móvel  $\rightarrow N \downarrow$  e  $k' \downarrow$



# Injeção: Preparação da amostra

---



- Correto:
  - FM: 30% MeOH; coluna RP-C18
  - Amostra dissolvida em 0-30% MeOH
- Errado:
  - FM: 30% MeOH; coluna RP-C18
  - Amostra dissolvida em 100% MeOH
  - Amostra dissolvida em 30% ACN

# Injeção: Preparação da amostra



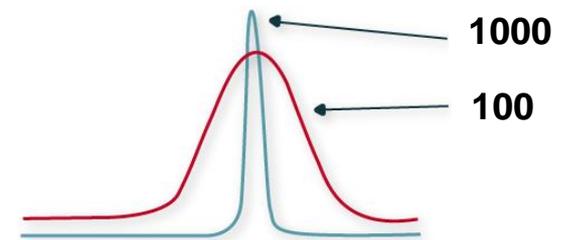
- Errado:

- FM: 60% ACN

- Amostra dissolvida em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$

- 5  $\mu\text{L}$   $\rightarrow$  N = 10493

- 10  $\mu\text{L}$   $\rightarrow$  N = 4088

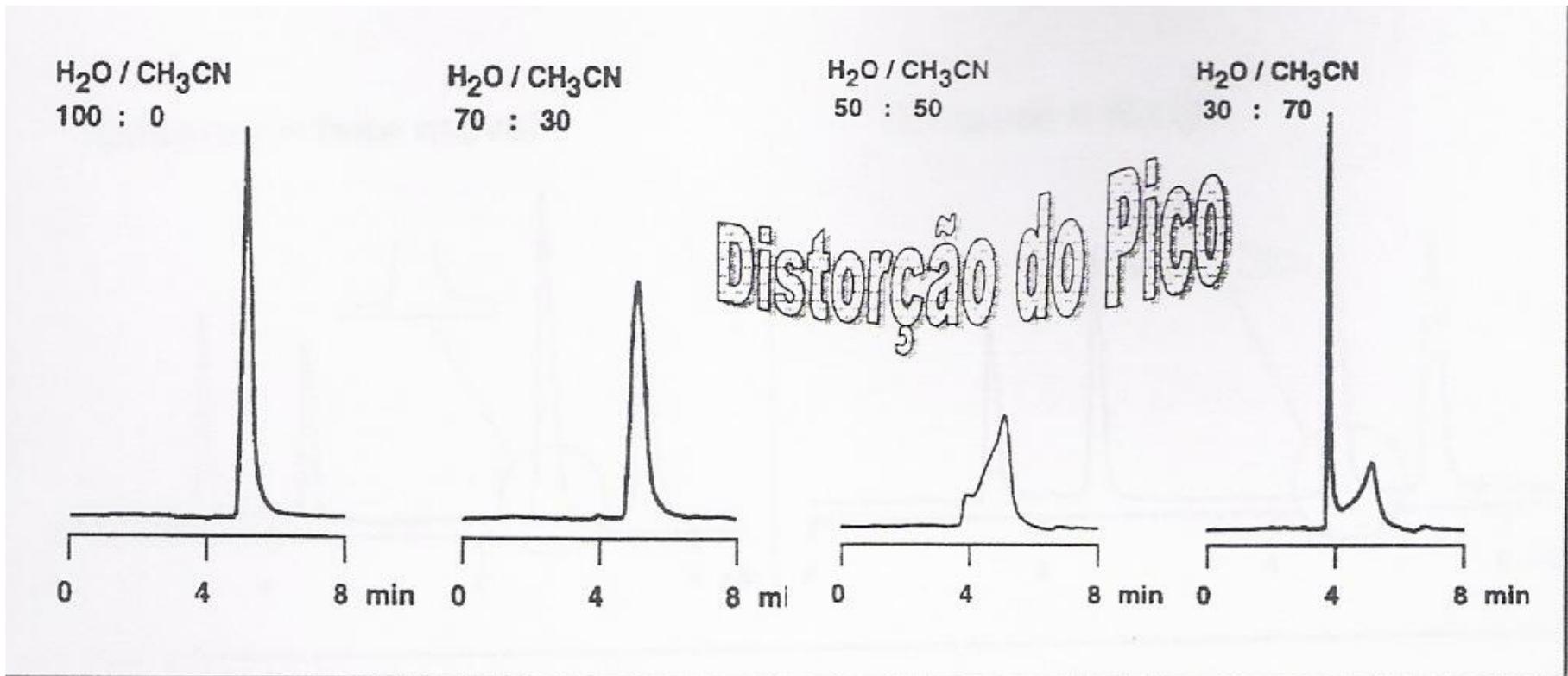


Sempre que possível dissolver a amostra na Fase Móvel ou em solventes mais fraco (menor % de orgânico – fase reversa)

# Injeção: Preparação da amostra



- FM: ACN:H<sub>2</sub>O (08:92)
- FE: C18 (250 x 4,6mm)
- Detecção: UV (210 nm)



# Volume máximo de injeção



- O volume máximo de injeção para qualquer coluna deve ser, no máximo, 1% do volume interno da coluna vazia

Volume interno da coluna

$$V_{\text{máx}} = (\pi \times r^2 \times C) (0,01)$$

r = raio interno em 'mm', C = comprimento em 'mm'

## 3 perguntas básicas antes da injeção:



→ A solução da amostra é miscível com a fase móvel?

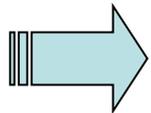
→ Qual é o volume máximo de injeção para minha coluna?

→ Qual é o  $V_0$  (volume de coluna ou volume morto) da coluna sendo usada (em 'mL' ou em 'min')?

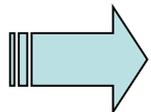
# Volume da coluna



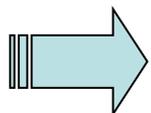
$V_0$  = Volume (tempo) de eluição de um pico não retido pela coluna.



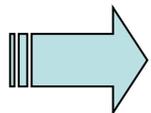
Normalmente é a 1ª perturbação da linha de base.



Volume mínimo que a bomba precisa bombear para qualquer amostra chegar até o detector.



Volume de fase móvel contido no sistema entre o injetor e o detector, inclusive dentro dos poros.



A coluna é responsável por 90-95% deste volume.

# Volume da coluna



- Determinar  $V_0$  por:
  - Fase reversa: injeção de hidrocarboneto saturado ou aromático (tolueno).
  - Fase normal: Injeção de água ou acetona.

- Cálculo aproximado:

Erro de 10-20% (3-10 $\mu$ m)

$$V_0 = (\pi \times r^2 \times C) (0,5)$$



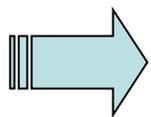
$r$  = raio interno em 'mm',  $C$  = comprimento em 'mm'

# $V_0$ = significado

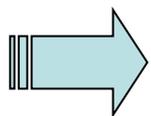
---



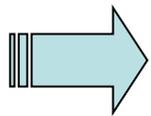
- Quaisquer picos ou grupo de picos que eluem junto ao  $V_0$ :



Não interagiram com a coluna e, contém prováveis impurezas (picos escondidos)



Não podem ser reconhecidos pelo tempo de retenção: afinal não houve retenção!



Não podem ser quantificados. Não haverá exatidão nem precisão na integração.

# COLONAS

## Tamanho da partícula



- Usar tamanho de partícula e comprimento da coluna suficientes para para separar a amostra de interesse

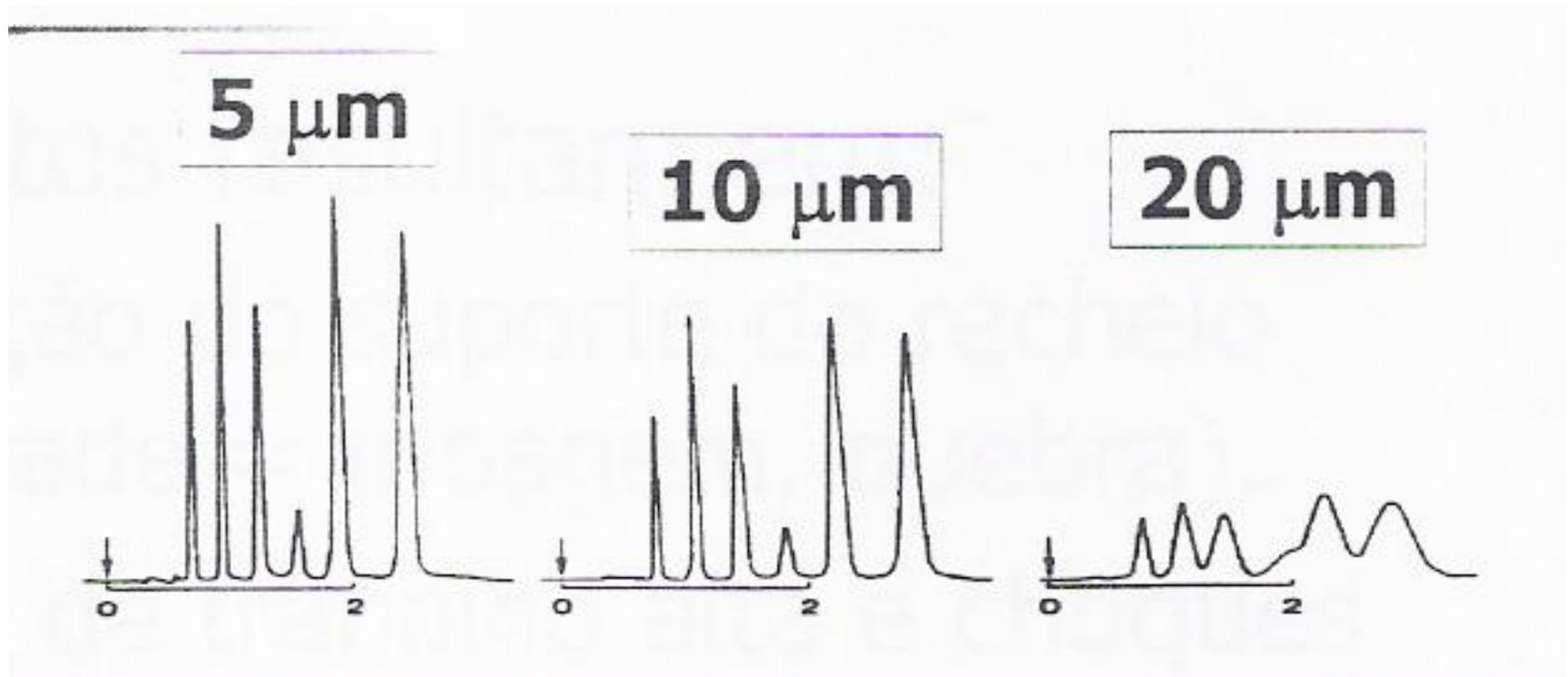
10  $\mu\text{m}$   $\rightarrow$  5  $\mu\text{m}$

↓ 2x  $\varnothing$   $\rightarrow$

P  $\rightarrow$  4P!!!

↓ PARTÍCULA  $\rightarrow$  ↑ PRESSÃO<sup>2</sup>

# Tamanho da partícula



# FE: Limites de fluxo



- Fluxos altos resultam em:
  - Destruição do suporte do recheio (velocidade = moagem, quebra)
  - Pressão de trabalho alta e choques de pressão



- ↳ degradação do leito
- ↳ desgaste dos selos da bomba e do injetor

**Fluxo ótimo depende do diâmetro de partícula e do diâmetro da coluna**

# FE: Limites de pressão



Pressão de operação:  
~150 vezes a Atm.

- As colunas são empacotadas numa única direção sob uma pressão de  $\pm 9000$  psi.
- Para uso contínuo, limite colunas de sílica  $\rightarrow$  3500 – 4000 psi.

# Flutuações de pressão

---



## PRESSÃO MUITO ALTA!

- Coluna suja
- Bloqueios (sistema filtro, pré-coluna, tubulação, válvula/seringa injetor, célula fluxo do detector)
- Solvente muito viscoso
- Checar fluxo

# Flutuações de pressão

---



## PRESSÃO MUITO BAIXA!

- Vazamentos (selos, conexões)
- Mal funcionamento da bomba (válvulas, pistão)
- Ar excessivo no sistema
- *Sinker* do solvente entupido
- Checar fluxo

# Flutuações de pressão

---



## PRESSÃO VARIÁVEL!

- Mal funcionamento da bomba (bolhas nas linhas de solventes ou válvulas)
- Bloqueios parciais no sistema

## SEM PRESSÃO!

- Reservatório solvente vazio
- Mal funcionamento da bomba (falha eletrônica ou na válvula de proporção)

# Flutuações de pressão

## Como minimizar?

---

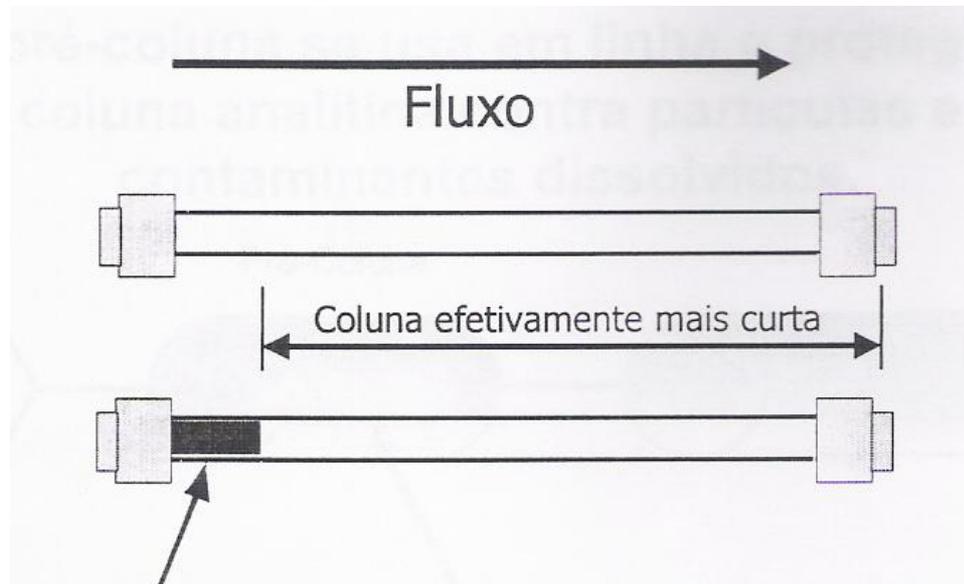


- Realizar a degaseificação da FM **DIARIAMENTE**
- Realizar a purga das bombas antes do início das análises
- Se possível, realizar uma mistura prévia entre os componentes da fase móvel
- Sempre que possível, utilizar sistemas isocráticos

# Contaminação da coluna



- Contaminação ocorre principalmente na entrada do leito



# Limpeza de coluna

---



- Solventes eficientes para limpeza devem: dissolvem bem a sujeira (não necessariamente os componentes ativos da amostra); competir bem com o recheio da coluna para a sujeira.
- Procedimentos de limpeza de colunas podem:
  - Precipitar contaminantes / tampões
  - Desnaturar proteínas
  - Acabar removendo um pouco da fase química ligada (hidrólise)
- É melhor usar SPE (extração em fase sólida) para limpar a amostra **antes** de injetar

# Limpeza de colunas:

## Fase normal

---



- Coluna de sílica: passar uma sequência de solventes (30-50 mL cada) pela coluna indo de apolar para polar e voltando para a fase móvel:
  - Hexano / octano / heptano
  - Diclorometano
  - Isopropanol / acetato de etila / THF
  - Metanol
  - Fase móvel



# Limpeza de colunas:

## Fase reversa

---



- Colunas de fase reversa ligada (C18, C8, fenil, CN)
  - Para limpar somente tampões, sais: passar H<sub>2</sub>O Milli-Q (10xV<sub>0</sub>) a 40-50°C
  - Para material orgânico: ACN:H<sub>2</sub>O 80:20 como fase móvel e fazer injeções grandes (100-200uL) de solventes ‘fortes’ como THF, acetato de etila. Pode-se aquecer a coluna a 40-50°C.



# Limpeza de colunas:

## Fase reversa

---



- Para a remoção de material orgânico o melhor solvente em geral é THF, devido a:
  - Sua grande força de eluição (polaridade)
  - Sua gama larga de dissolução das substâncias mais variadas
  - Sua miscibilidade com todos as fases
- Metanol mesmo puro não é um solvente forte para limpeza de material orgânico lipofílico devido a sua alta polaridade



# DETECTORES: Manutenção

---



- Lembre-se: lâmpadas têm tempo de vida limitado
  - \* Lâmpada Deutério: 500-2.000 horas
- Não dar “flush” nas colunas passando pelo detector
- Problemas na linha de base podem ser elétricos (Assistência Técnica) ou mecânicos (bolha de ar, lâmpada velha, sujeira na célula de fluxo)



# Problemas??

---



- Mudanças no tempo de retenção são geralmente devidas a problemas na bomba ou vazamento
- Mudanças na área do pico estão geralmente associadas com injetor, autosampler ou sistema de tratamento dos dados



# Problemas → Pico

---



- Resolução ruim: coluna inadequada, fase móvel muito forte
- Pico largo: coluna inadequada, alargamento banda, fluxo inadequado.
- Pico dividido: co-eluição, problemas entrada coluna
- Sem pico: lâmpada desligada/ruim, problema injetor, analito adsorvido



# Problemas → Pico

---



- Picos com cauda: interação forte com coluna, coluna suja, coluna inadequada
- Pico com cauda frontal: *overloading*
- Picos extras: coluna/solventes/injetor contaminados, *carry over*



# Problemas → Linha de Base

---



- Ruído: fonte (lâmpada) detector velha, solventes sujos, O<sub>2</sub> no sistema
- *Background* alto: contaminação solvente, *cut off* solvente UV



# Estratégia para Resolução de Problemas em HPLC

---



- **BOAS PRÁTICAS DE OPERAÇÃO !!!!**
- **Isolar a área do problema**
- **Mudar um componente de cada vez**
- **Consertar você mesmo (?)**  
**ou chamar Assistência Técnica**
  - **Consultar manuais operação/serviço**
- **Manutenção preventiva**



# SOLUCIONADOR DE PROBLEMAS



# iGracias!



**Geison Modesti Costa, MSc.**

**(geison\_costa@yahoo.com.br)**

Laboratório de Química Farmacêutica

Depto. Ciências Farmacêuticas

Universidade Federal de Santa Catarina

UFSC

